



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/00, 15/90	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 90/07576 (43) Date de publication internationale: 12 juillet 1990 (12.07.90)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR89/00673 (22) Date de dépôt international: 22 décembre 1989 (22.12.89) (30) Données relatives à la priorité: 88/17185 26 décembre 1988 (26.12.88) FR (71) Déposant: SETRATECH [FR/FR]; 31, rue de la Liberté, F-75019 Paris (FR). (72) Inventeurs: RADMAN, Miroslav ; 4, rue du Puits-de-l'Er- mite, F-75005 Paris (FR). RAYSSIGUIER, Christiane ; Les Vignes-de-Bures, F-91940 Les Ulis (FR). (74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet euro- péen), BR, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK, ES (brevet européen), FI, FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, KR, LU (brevet européen), MC, NL (brevet européen), NO, SE (brevet européen), SU. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: <i>IN VIVO</i> RECOMBINATION PROCESS FOR PARTIALLY HOMOLOGOUS DNA SEQUENCES (54) Titre: PROCEDE DE RECOMBINAISON <i>IN VIVO</i> DE SEQUENCES D'ADN PARTIELLEMENT HOMOLOGUES (57) Abstract <p><i>In vivo</i> recombination process for partially homologous DNA sequences having up to 30% base mismatches. Said sequences are contacted in cells or in an organism whose enzymatic system for repairing mismatches is deficient or has been temporarily inactivated by saturation for a period of time sufficient to achieve recombination between said DNA sequences or any other mutant which increases intergenetic recombination.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne un procédé de recombinaison <i>in vivo</i> de séquences d'ADN partiellement homologues représentant jusqu'à 30 % de mésappariements de bases. Selon sa caractéristique essentielle, on met en présence lesdites séquences dans des cellules ou un organisme dont le système enzymatique de réparation des mésappariements est défectueux ou a été inactivé transitoirement par saturation le temps d'obtenir la recombinaison entre lesdites séquences d'ADN ou tout autre mutant qui augmente la recombinaison intergénérique.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Fasso	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NO	Norvège
BJ	Bénin	IT	Italie	RO	Roumanie
BR	Brésil	JP	Japon	SD	Soudan
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

PROCEDE DE RECOMBINAISON IN VIVO DE SEQUENCES D'ADN
PARTIELLEMENT HOMOLOGUES

5 La présente invention concerne un procédé de recombinaison
in vivo de séquences d'ADN partiellement homologues présentant une
proportion importante de mésappariements de bases pouvant aller
notamment jusqu'à 30 %.

10 Il est ainsi possible de recombinaison des gènes individuels, au
niveau de cellules ou d'organismes d'espèces et genres différents ayant
partagé les mêmes ancêtres.

15 La présente invention concerne également un procédé de
production d'organismes recombinés par croisement et recombinaison in
vivo d'organismes d'espèces et/ou de genres différents, ainsi qu'un procédé
de production in vivo de gènes hybrides et donc des protéines hybrides
codées par ceux-ci.

20 Lors de la synthèse de l'ADN, des erreurs peuvent se produire
et conduire à des paires de bases non complémentaires appelées
mésappariements. Il existe un processus de correction des erreurs (mésap-
pariements et non appariements des bases) dans le DNA. Ce processus fait
intervenir un système enzymatique. Ainsi, chez les bactéries Escherichia
Coli et Salmonella typhimurium les erreurs sont très rapidement et
précisément détectées par deux enzymes (MutS et MutL) permettant à une
troisième enzyme (MutU) de dérouler les deux brins d'ADN et à une
quatrième enzyme (MutH) de couper le brin néosynthétisé sur une séquence
25 du DNA (GATC) elle-même méthylée plus tard par une autre enzyme
(réf. : 1). Les erreurs les plus fréquentes G:T, A:C et plus ou moins une
base, sont les plus efficacement réparées. Les erreurs pas ou mal détectées
par les enzymes Mut (G:A, C:T et C:C dans certains endroits) ont une
structure particulière "ouvrant" les deux brins.

30 Jusqu'à maintenant, l'obtention d'espèces hybrides ou de gènes
hybrides se heurtait à de nombreux problèmes. Pour ce qui est d'espèces
hybrides, les tentatives les plus avancées faites in vitro dans le domaine
végétal par fusion de cellules se heurtaient au problème majeur de
l'instabilité génétique. Quant à l'obtention de gènes ou enzymes hybrides,

elle était possible uniquement in vitro par génie génétique.

Le but de la présente invention est de faire de nouvelles espèces hybrides ou, à fortiori, de nouveaux gènes ou enzymes hybrides par recombinaisons intergénériques et/ou interspécifiques in vivo avec une
5 efficacité et une facilité accrue.

Pour ce faire, et selon une première variante de l'invention, on utilise des mutants défectueux dans le système de réparation des mésappariements de bases de l'ADN ou tout autre mutant qui augmente la recombinaison intergénérique.

10 On peut citer notamment les souches mut, en particulier mut L, S, H ou U de Escherichia coli et Salmonella typhimurium ou encore les souches hex de Streptococcus pneumoniae (réf. : 2) et pms chez la levure (réf. : 3)

15 En effet, on a découvert selon l'invention que le mécanisme moléculaire de la spéciation, et donc de l'apparition d'une nouvelle espèce, peut impliquer de façon critique l'activité des enzymes de correction des mésappariements et seulement elles. L'invention consiste en effet à exploiter le rôle d'"antirecombinaison" stimulé par les mésappariements de bases d'ADN qu'ont les enzymes de réparation de ces mésappariements. Ce
20 rôle définit un mécanisme moléculaire de la spéciation, c'est-à-dire de la séparation génétique initiale de nouvelles espèces.

Toutefois, au lieu de l'utilisation des mutants défectueux dans le système enzymatique de réparation des mésappariements de bases de l'ADN, on peut inactiver transitoirement ce système le temps d'obtenir les
25 recombinaisons voulus, notamment par saturation.

Compte tenu du fait que les mutants de réparation des mésappariements sont génétiquement instables, il peut être intéressant d'utiliser une déficience transitoire nécessaire à la construction génétique désirée avant de revenir à la stabilité génétique normale. Le problème
30 principal en biotechnologie classique est l'instabilité génétique des souches "industrielles". Après la sélection du variant voulu, sa propre stabilité génétique est compromise et il reverse vers le type sauvage au cours de la croissance dans le fermenteur.

La stratégie pour l'inactivation transitoire du système de correction des mésappariements selon l'invention est double :

a) Utilisation d'un mutant de correction conditionnel ($\text{mutS}^{\text{ts-1}}$)

d'Escherichia coli pour toute construction génétique chez E. coli, et

5 b) Saturation, c'est-à-dire inactivation fonctionnelle du système de correction par l'introduction dans la cellule d'un grand nombre de mésappariements. Cette méthode est applicable à n'importe quel organisme.

10 La présente invention a donc pour objet un procédé de recombinaison in vivo de séquences d'ADN partiellement homologues, caractérisé en ce qu'on met en présence lesdites séquences dans des cellules ou un organisme dont le système enzymatique de réparation des mésappariements de bases est défectueux ou a été inactivé transitoirement par saturation le temps d'obtenir la recombinaison entre lesdites séquences
15 d'ADN ou encore en utilisant des mutants qui augmentent la recombinaison intergénérique.

Il convient donc le cas échéant que l'une au moins des enzymes soit inactivée, à savoir une enzyme impliquée dans la reconnaissance ou dans la correction proprement dite des erreurs.

20 Les séquences d'ADN en cause à recombinaison peuvent être chromosomiques ou extra-chromosomiques permettant dans ce dernier cas la recombinaison entre des gènes individuels clonés.

Comme application de ce procédé de recombinaison in vivo, la présente invention a également pour objet un procédé de production in vivo
25 de gènes hybrides et de leur protéines codées, caractérisé en ce qu'on met en présence dans ledit organisme défectueux ou inactivé dans le système enzymatique de réparation des mésappariements de bases, deux dites séquences d'ADN consistant en des gènes partiellement homologues issus de deux organismes différents, et on sélectionne le gène hybride recherché ou
30 sa protéine codée. Il s'agit dans ce cas de production in vivo extra-chromosomique.

On pourra introduire par exemple sur des plasmides les deux gènes partiellement homologues codant pour une même fonction mais ayant une séquence différente et des propriétés enzymatiques du produit différentes puis sélectionner sur boîte de Pétri parmi les milliers de

différentes recombinaisons obtenues celles qui pourraient nous intéresser. Ceci correspondrait autrement à un travail immense du génie génétique in vitro.

5 La présente invention fournit également un procédé de production in vivo de gènes hybrides, et de leur protéines codées dans lequel un premier gène d'un premier organisme est porté par un premier plasmide et un second gène partiellement homologue d'un second organisme sont introduits par transformation dans une bactérie dont le système enzymatique de réparation des mésappariements est défectueux ou dans
10 tout autre bactérie mutante qui augmente la recombinaison intergénérique ou dans une bactérie dont le système de réparation des mésappariements est transitoirement inactivé, les gènes se recombinent et l'on sélectionne le gène hybride recherché ou sa protéine codée.

15 En particulier, dans le procédé ci-dessus, la bactérie transformée avec les plasmides portant les gènes à recombinaison peut être une souche E. coli ou Salmonella typhimurium défectueuse ou transitoirement inactivée dans le système enzymatique de réparation des mésappariements ou tout autre mutant de telle bactérie qui augmente la recombinaison intergénérique.

20 Avantageusement, pour toute construction chez E. coli, on utilisera une souche thermosensible pour la fonction de réparation des mésappariements, par exemple la souche E. coli mutS^{ts-1} qui est mutatrice mutS⁻ à 42°C et normale mut⁺ à 32°C. On active la recombinaison hétérospécifique à 42°C, on sélectionne le caractère recherché à 32°C.

25 L'invention a pour objet en application du procédé de recombinaison in vivo selon l'invention un procédé de production de cellules recombinées par des techniques de transformation ou fusion, caractérisé en ce que :

- 30 - on effectue une transformation et une recombinaison in vivo :
- . à l'aide de l'ADN de cellules d'un organisme d'une première espèce et d'un premier genre,
 - . avec l'ADN chromosomique des cellules d'un organisme d'une deuxième espèce et/ou d'un deuxième genre,

ces cellules de l'organisme de deuxième espèce ou genre étant défectueuses dans les systèmes enzymatiques de réparation des mésappariements ou ayant ledit système inactivé transitoirement, notamment par saturation, ou

bien

- on effectue la recombinaison in vivo des chromosomes de ces deux types de cellules après fusion desdites cellules, celles-ci ayant toutes deux un système enzymatique de réparation des mésappariements défectueux ou ayant ledit système inactivé transitoirement notamment par saturation.

L'invention a également pour objet en application du procédé de recombinaison in vivo selon l'invention, un procédé de production d'organismes recombinés par croisement et recombinaison in vivo d'organismes d'espèces et/ou de genres différents, caractérisé en ce qu'on effectue un croisement et une recombinaison in vivo entre :

- un organisme d'une première espèce et d'un premier genre, et
- un organisme d'une deuxième espèce et/ou d'un deuxième genre,

l'un au moins de ces deux organismes étant défectueux dans le système enzymatique de réparation des mésappariements ou ayant ledit système inactivé transitoirement, notamment par saturation.

Dans le procédé de production de cellules ou d'organismes recombinés selon l'invention, on peut produire des cellules ou des organismes recombinés de bactéries, mais aussi de levures, de plantes ou même d'animaux.

En particulier, l'invention a pour objet un procédé de production de bactéries recombinées par croisement et recombinaison de bactéries d'espèces et/ou de genres différents, caractérisé en ce qu'on effectue une conjugaison ou une transduction in vivo entre

- des bactéries dites réceptrices d'une première espèce et d'un premier genre qui sont défectueuses dans les systèmes enzymatiques de réparation des mésappariements de base ou dont les systèmes enzymatiques de réparation des mésappariements de bases sont inactivés transitoirement, notamment par saturation, et
- des bactéries dites donneuses, d'une deuxième espèce et/ou d'un deuxième genre qui comportent un caractère particulier que l'on souhaite transférer aux cellules réceptrices.

Avantageusement, les bactéries dites réceptrices sont en outre défectives dans les systèmes enzymatiques de restriction de l'ADN.

L'invention s'est traduite de façon spectaculaire dans le domaine de la conjugaison de bactéries. Les deux genres bactériens Escherichia coli et Salmonella typhimurium qui se sont séparés génétiquement il y a 140 millions d'années (Ochman et Wilson 1987) ne se croisent pas du tout aujourd'hui par recombinaison du DNA.

Les croisements par conjugaison entre Salmonella typhimurium et Escherichia coli sont en effet stériles, c'est-à-dire que la recombinaison est absente ou très faible selon le locus considéré (Baron et al. 1959 ; Einsenstark 1965, Mergeay et Gerits 1983). Toutefois, quand on élimine les fonctions MutL ou MutS par exemple, par mutations, de ces souches on obtient de nouveau, après 140×10^6 années, un croisement par recombinaison très efficace (au moins 10^6 fois plus élevé que chez les bactéries non mutées). Ainsi le rôle des enzymes de réparation dans la stérilité interspécifique et intergénérique est attesté dans des croisements bactériens.

Dans un mode de réalisation particulier du procédé de production de bactéries recombinées selon l'invention, on croise une souche de E. Coli et une souche de Salmonella typhimurium dont l'une au moins (la réceptrice) est défectueuse ou inactivée, notamment par saturation dans son système enzymatique de réparation des mésappariements de bases.

De préférence, on conjuguera une bactérie donneuse du type Hfr avec une bactérie réceptrice du type F^- .

Dans un mode de réalisation particulier, on a réalisé selon l'invention la conjugaison entre une souche E. Coli donneuse Hfr et une souche Salmonella typhimurium F^- mutante défective pour le système enzymatique de réparation des mésappariements de base du type mutS ou mutL, c'est-à-dire défective pour les protéines MutS et MutL qui interviennent dans la reconnaissance des mésappariements.

Le procédé de production des bactéries recombinées selon l'invention peut conduire à la fabrication de souches nouvelles, par exemple des souches de Salmonella pathogènes atténuées, rendues non toxiques par croisement avec des souches Escherichia coli mais portant toujours les déterminants antigéniques de surface des souches pathogènes, ceci pour produire le vaccin contre la Salmonellose correspondante.

En application du procédé de production d'organismes recombinés selon l'invention, un autre objet de la présente invention est un procédé de production in vivo de gènes hybrides et de leurs protéines codées, à partir de deux gènes partiellement homologues caractérisé en ce qu'on prépare des cellules recombinées à partir de cellules dudit premier organisme qui contiennent un premier gène et les cellules dudit deuxième organisme qui contiennent un second gène partiellement homologue, et on sélectionne le gène hybride recherché ou sa protéine codé.

On peut, en particulier, en utilisant les mutants de réparation des mésappariements de base, croiser des bactéries d'origines différentes et produire ainsi des gènes nouveaux et sélectionner les propriétés recherchées. Il s'agit dans ce cas de gènes chromosomiques.

Comme mentionné précédemment, l'utilisation de mutants en système enzymatique de réparation des mésappariements de base peut être remplacée par la saturation du système enzymatique en introduisant par transfection un hétéroduplex d'ADN riche en mésappariements.

La présente invention a enfin pour objet un procédé de mutagenèse inverse ciblée d'un gène dans un organisme ledit gène comportant une base mutée que l'on veut rétablir telle qu'avant sa mutation, caractérisé en ce qu'on introduit un hétéroduplex comportant un nombre élevé de mésappariements pour inactiver par saturation le système enzymatique de correction des mésappariements de l'organisme, et un oligonucléotide consistant dans la séquence d'ADN rétablie telle qu'avant mutation du gène.

Selon ce procédé, il est possible d'obtenir des changements génétiques ciblés avec des oligonucléotides de synthèse en les introduisant en grande quantité dans des cellules pendant une période d'inactivation fonctionnelle du système de réparation des mésappariements.

5 D'autres avantages et caractéristiques de la présente invention apparaîtront à la lumière des exemples qui vont suivre.

La figure 1 représente le profil de restriction de trois recombinants intergénériques à partir de croisements de Escherichia coli Hfr et Salmonella typhimurium F⁻.

10

EXEMPLE 1 CONJUGAISON DE SOUCHES E. coli Hfr et Salmonella thyphimurim F⁻

15 On a réalisé des conjugaisons entre Hfr sauvages d'E. Coli et F⁻ de Salmonella Typhimurium défectives dans les systèmes de restriction du DNA, et de surcroît défectives pour les systèmes de réparation des mésappariements (mutants mutL, mutS, mutH ou MutU).

20 La souche Hfr de E. Coli a son origine de transfert à 76,5 minutes sur la carte et xylose est le marqueur injecté en premier (78'). Les souches F⁻ de Salmonella possèdent deux auxotrophies (met A et met E) et une incapacité à utiliser le xylose (xyl⁻) ; elles sont résistantes à la streptomycine. La souche Hfr de E. Coli est sauvage pour ces marqueurs et sensible à la streptomycine ; elle possède deux autres auxotrophies (leucine et thréonine) ce qui permet une triple contresélection lors des conjugaisons.

25 Les souches Hfr de E. Coli et F⁻ Salmonella mut⁺, mutL, mutS, mutH ou mutU défectives pour les systèmes de restriction sont cultivées en milieu liquide riche (LB). Lorsqu'elles sont en phase exponentielle (1 à 5 10⁸/ml), on mélange 1 ml de Hfr et 1 ml de F⁻ et on filtre immédiatement le

30

mélange sur filtre millipore. Ce filtre est mis à incuber à 37°C sur une boîte de milieu riche préchauffée. On laisse la conjugaison se faire pendant 40 minutes et le filtre est récupéré et mis dans 1 ml de MgSO_4 10^{-2}M puis vortexé vigoureusement pendant 1 minute pour resuspendre les bactéries et
5 séparer les conjuguants. Les aliquots sont étalés sur des boîtes de milieu sélectif : milieu minimum 63 (réf. : Miller J.H. 1972, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, N.Y.) avec glucose (0,4 %) et sans méthionine pour sélectionner les met^+ ou
10 avec xylose pour seul sucre (0,4 %) et avec méthionine (100 $\mu\text{g/ml}$) pour sélectionner les xyl^+ . Ces deux milieux sélectifs ne contiennent ni thréonine ni leucine mais contiennent de la streptomycine (25 $\mu\text{g/ml}$) pour assurer une triple contre sélection des Hfr. Les boîtes sont incubées à 37°C 40 heures, 60 heures et 88 heures et les clones recombinés comptés et étudiés. Une expérience témoin correspondant au croisement homo-
15 spécifique Hfr Coli x F^- Coli est réalisée dans les mêmes conditions.

De surcroît, les souches F^- de Salmonella ont été rendues mutantes pour recA (la protéine recA est indispensable à toute recombinaison homologue).

Les résultats obtenus pour les souches mutL et mutS pour
20 lesquelles l'effet est le plus important sont décrit dans le tableau 1 ci-dessous. Ce tableau indique la fréquence des réceptrices F^- devenues xyl^+ par bactérie Hfr donneuse après soustraction des révertants obtenus avec les souches réceptrices seules (incubation 60 heures). Des résultats équivalents ont été obtenus pour le marqueur met .

25

30

Tableau 1

5	Conjugaisons	Frequence xyl^+ /Hfr donneuse
	<u>Coli</u> Hfr + <u>Coli</u> F^-	$1.3 \cdot 10^{-1}$
	<u>Coli</u> Hfr + <u>Sal.</u> $mut^+ F^-$	$6.7 \cdot 10^{-7}$
10	<u>Coli</u> Hfr + <u>Sal.</u> $mutL F^-$	$2.1 \cdot 10^{-3}$
	<u>Coli</u> Hfr + <u>Sal.</u> $mutS F^-$	$1.7 \cdot 10^{-3}$
	<u>Coli</u> Hfr + <u>Sal.</u> $mut^+ recA F^-$	$4.3 \cdot 10^{-8}$
	<u>Coli</u> Hfr + <u>Sal.</u> $mutL recA F^-$	$1.8 \cdot 10^{-8}$
15	<u>Coli</u> Hfr + <u>Sal.</u> $mutS recA F^-$	$6 \cdot 10^{-8}$

La fréquence de recombinaison intergénériques augmente d'un facteur d'au moins 10^4 pour $mutL$ et $mutS$, et légèrement plus faible pour $mut H$ et U par rapport aux conjugaisons faites avec *Salmonellas* F^- défectives pour la restriction du DNA mais sauvages pour les gènes de réparation des mésappariements (mut^+). Par sélection de recombinants sur milieux sélectifs, nous avons pu obtenir ces hybrides entre E. Coli et Salmonella Typhimurium qui, nous le pensons, sont des espèces nouvelles "Eschenella" ou "Salmorichia" avec de nouvelles combinaisons de gènes et des gènes recombinés nouveaux.

Des recombinés prototrophes (met^+) et capables de fermenter le sucre xylose (xyl^+) obtenus par recombinaison interspécifique peuvent être formés par des mécanismes divers. Le plus simple est le remplacement direct du gène, résultat habituel de la conjugaison $recA$ -dépendante entre E. coli ou entre S. typhimurium (conjugaison intraspécifique). Les deux autres mécanismes possibles conduisent à la formation de diploïdes partiels. Ces types de recombinants diffèrent quant à leur stabilité. On s'attend à ce

que les remplacements simples soient stables et les diploïdes partiels instables. En conséquence, on a vérifié la stabilité phénotypique des recombinants de chaque croisement en striant sur des boîtes indicatrices (1 % xylose McConkey medium ref. Miller, J.H. Experiments in molecular genetics (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1972)). Dans l'ensemble, les profils de stabilité des recombinants intergénériques révèlent un groupe hétérogène.

Tableau 2 : Analyse des recombinants xyl⁺ et metE⁺ metA⁺ des croisements de conjugaison E. coli Hfr X S. typhimurium F⁻

F ⁻ réceptrice	Marqueurs		Recombinants xyl ⁺	
	% met ⁺ dans xyl ⁺	% xyl ⁺ dans met ⁺	stable : instable :	Transposon perte
<u>S. typhimurium</u> :				
mut ⁺	7.7 (389)	5.8 (412)	33:1	
mutL::Tn10	3.6 (412)	9.4 (412)	8:27	7/8, 0/27
mutS::Tn10	8.7 (412)	6.6 (375)	1:34	0/1, 0/34
mutH::Tn5	10.7 (412)	1.9 (412)	7:28	0/7, 0/28
mutU::Tn5	2.4 (412)	22.0 (412)	19:16	19/19, 3/16
<u>E. coli</u> :				
mut ⁺	63.1 (412)	18.9 (412)	20:0	

Pour savoir si les gènes mut⁺ de Escherichia ont remplacé les gènes mut de Salmonella, on a suivi le devenir des transposons insérés dans les gènes mut de Salmonella : si le gène mut de E. coli fonctionnel a remplacé le gène résidant mut portant Tn, alors le recombinant aura perdu à la fois sa résistance aux antibiotiques et son caractère mutant. Ceci s'est effectivement passé pour 7 des 8 des recombinants xyl⁺ met⁺ stables obtenus dans le croisement avec une souche réceptrice S. typhimurium

mutL::Tn10 suggérant que, excepté pour un recombinant, les séquences d'Escherichia coli ont remplacé les séquences de Salmonella jusqu'à environ 5 min après le dernier gène sélectionné (metA) dans la région mutL. Dans le croisement avec S. typhimurium mutU::Tn5 comme souche réceptrice, le gène mutU a été remplacé chez 19 des 19 recombinants xyl⁺ stables. Aucun des recombinants xyl⁺ met⁺ des croisements de mutS::Tn10 et mutH::Tn5 n'ont montré une perte de transposon ou un remplacement de gène mut car la conjugaison a été interrompue au bout de 40 min et la région chromosomique des gènes mutS, mutH n'a pas été transférée.

La figure 1 montre la liaison physique entre les séquences de Salmonella et Escherichia coli. L'ADN génomique des deux souches parentales et leurs trois recombinants intergénériques xyl⁺ met⁺ stables (respectivement des croisements mutL, mutS et mutH) a été coupé par l'enzyme SpeI et les fragments ont été séparés par électrophorèse sur gel à champ pulsé sur un appareil Beckman Gene Line TAFE. Les deux plus grands fragments d'ADN des S. typhimurium F⁻ parentales (Δ) sont absents dans les trois recombinants qui, à la place, ont acquis au moins un fragment non parental que l'on pense contenir une jonction d'ADN inter-espèce. En outre, au moins un grand fragment de restriction d'ADN de E. coli Hfr (▽) est observé dans les recombinants L17 et S12 (L17 est le recombinant qui a été déposé sous le numéro I832).

La souche de S. typhimurium utilisée mutL F⁻ a été déposée sous la référence SL4213 mutL (n° I831) à la CNCM de l'Institut Pasteur.

Un recombinant intergénérique E. coli Hfr/S. typhimurium F⁻ mutL a aussi été déposé sous la référence SCL17 (n° I832) à la CNCM de l'Institut Pasteur.

EXEMPLE 2 RECOMBINAISON HETEROSPECIFIQUE DANS L'OPERON HISTIDINE : REMPLACEMENTS DES GENES DE SALMONELLA TYPHIMURIUM PAR CEUX D'ESCHERICHIA COLI

La stratégie expérimentale pour mesurer la fréquence de

remplacements des gènes par la recombinaison hétérospécifique entre Salmonella typhimurium et Escherichia coli a été la suivante :

(1) On a utilisé comme souche "réceptrice" d'information génétique S. typhimurium LT2 portant deux gènes défectifs dont on a cherché la récupération fonctionnelle par la recombinaison :

- hisD::IS200 avec une mutation rendant la cellule His⁻ (incapable de synthétiser l'histidine, même en présence d'un intermédiaire histidinol) et
- proAB47 avec une délétion qui rend la souche incapable de synthétiser la proline (pro⁻) (ref. Lam, S. and Roth, J.F. (1983) Cell 34 951-960 ; Csonka, L.N. (1981) Mol. Gen. Genet. 182 82-86). HisD:IS200 correspond à l'insertion d'un élément transposable inactivé et ne retourne jamais vers hisD⁺.

La souche donneuse d'information génétique est soit une souche S. typhimurium avec les opérons histidine et proline intacts (his⁺ et pro⁺), soit une souche de S. typhimurium déletée pour l'opéron his (his644), mais rendu his⁺ par l'acquisition d'un épisome d' E. coli, F'150 his⁺ portant l'opéron his d'E. coli (ref. hartman et al., (1971) Adv. Genet. 16, 1-34 ; Low, K.B. (1973) Bact. Rev. 36, 587-607).

(2) Le transfert génétique de la donatrice dans la réceptrice s'effectue à l'aide d'un bactériophage transducteur p22 Hft int3 (Schnieger. H. (1972) Mol. Gen. Genet 119, 75-88). C'est une méthode classique de transfert des gènes (Miller, I.H. "Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. 1972) : on produit un stock de phages en le laissant croître sur la souche donneuse puis on infecte la souche réceptrice avec une multiplicité d'infection par bactérie et on étale les bactéries infectées sur les boîtes dites "sélectives" sur lesquelles ne poussent que les bactéries ayant acquies le caractère génétique de la souche donneuse (par exemple, la gélose M63 milieu minimum (voir Miller ci-dessus) avec la proline mais sans l'histidine et avec l'histidinol (30 µg/ml) pour détecter les bactéries hisD⁺, ou avec histidine et arginine mais sans proline pour détecter les bactéries pro⁺). On compte les colonies hisD⁺ ou pro⁺ après 2 jours d'incubation à 37°C.

Une façon d'exprimer les variations dans la recombinaison homéologue (intergénérique) par rapport à la recombinaison homologue (intraspécifique) est de déterminer le rapport des transductants hisD⁺ et pro⁺ pour un lysat de P22Hft int3 provenant soit de la donneuse hisD⁺ d'E.coli, soit de la donneuse hisD⁺ de S. typhimurium (les deux souches ayant les mêmes proAB de Salmonelle).

Le tableau 3A montre ces deux rapports hisD⁺/proAB⁺ (hétérospécifiques et homospécifiques) pour la souche sauvage mut⁺ et les dérivés mutL, mutS, mutU et mutH de la souche réceptrice. On voit que le rapport hisD⁺/proAB⁺ pour hisD hétérospécifique augmente de plus de 100 fois dans les bactéries mutS et mutL tandis que dans mutH augmente un peu moins et mutU très peu. Le rapport n'augmente pas plus que d'un facteur de 4 quand la donneuse est hisD⁺ et proAB⁺ de la Salmonella. Ces résultats corroborent les résultats de la conjugaison mais d'une façon qualitative.

Le remplacement des gènes est démontré ici en utilisant comme marqueur génétique de la déficience en hisD un transposon défectif Tn10-dcam portant la résistance au chloramphénicol (10 µg/ml) et ayant détruit le gène hisD en s'insérant dans le gène (Eliott, T. et Roth, J.R. (1988) Mol. Gen. Genet. 213, 332-338). Le remplacement du gène défectif hisD::Tn10d-cam par le gène fonctionnel hisD⁺ d'E.coli aura deux effets phénotypiques concomittants :

- (i) La bactérie réceptrice devient hisD⁺ (croît en présence histidinol ; phénotype désigné Hol⁺) et
- (ii) Elle perd son transposon Tn10d-cam et devient sensible au chloramphénicol.

Le tableau 3B montre qu'aucun transductant hisD⁺ n'a retenu la résistance au chloramphénicol, tandis que les transductants pro⁺ (les gènes proAB sont loin du gène hisD) maintiennent leur résistance au chloramphénicol.

Tableau 3 : croisement par transduction

A. Les alleles mutants favorisent la faculté de séquences E. coli à donner la prototrophie histidinol à S. typhimurium

	Allele mut de souche réceptrice	Croisements hétérospécifiques Hol ⁺ : E. coli Pro ⁺ : S. typhimurium	Croisements homospécifiques Hol ⁺ : S. typhimurium Pro ⁺ : S. typhimurium
		Hol ⁺ /Pro ⁺ (x 10 ⁴)	Hol ⁺ /Pro ⁺
5			
10	mut ⁺	4	320
	mutL #1	355	180
	mutL #2	147	150
	mutS #1	696	130
	mutS #2	451	160
15	mutU #1	20	460
	mutU #2	10	520
	mutH #1	37	180
	mutH #2	170	190

B. Transduction interspécifique par remplacement allélique

	Allele mut de souche réceptrice	Contenu des plaques	Sélection des plaques	Nombre moyen de colonies
20	mut ⁺	Pro, Hol	Hol ⁺	5
		Pro, Hol, Cam	Hol ⁺ Cam ^r	0
		His, Arg	Pro ⁺	478
		His, Arg, Cam	Pro ⁺ Cam ^r	498
25	mutS	Pro, Hol	Hol ⁺	168
		Pro, Hol, Cam	Hol ⁺ Cam ^r	0
		His, Arg	Pro ⁺	1344
		His, Arg, Cam	Pro ⁺ Cam ^r	1110

30

Légende :

Hol⁺ = croissance en présence d'histidinol

Pro = proline

Arg = arginine

Cam = chloramphénicol

EXEMPLE 3 INACTIVATION PAR SATURATION TRANSITOIRE DU SYSTEME DE REPARATION DES MESAPPARIEMENTS

5 Chez E. coli, le système de correction des erreurs Mut (H, L, S, U) est limité et peut être saturé par la titration c'est-à-dire l'inactivation fonctionnelle de la protéine MutL.

La souche qui est la plus forte mutatrice connue E. coli mutD5 est défectueuse en lecture de correction exonucléasique associée à la DNA polymérase III, donc elle produit beaucoup d'erreurs de réplication.

10 On a démontré par la transfection avec un DNA hétéroduplex des phages ϕ X 174 ou λ que, en pleine croissance, en milieu riche, ces bactéries sont déficientes en réparation des mésappariements. Mais si l'on arrête la réplication du DNA bactérien (phase stationnaire ou arrêt spécifique de la réplication par une mutation thermosensible) l'activité
15 réparatrice est récupérée totalement. Cette réparation est bloquée si l'on bloque la synthèse protéique de novo par le chloramphénicol. Donc, le système Mut n'est pas seulement saturé mais "mort" et il faut resynthétiser les enzymes ou l'enzyme de réparation.

Un test de réparation des mésappariements in vivo utilise
20 comme substrat des molécules déterminées construites in vitro par la séparation des brins de l'ADN et la reconstitution de duplexes nouveaux du type hétéroduplexes. En utilisant des gènes mutants déterminés quant à leur séquence, il est possible de construire des molécules avec un seul méasappariement déterminé. Nous avons employé un gène mutant dans le
25 gène cI codant pour le répresseur du bactériophage lambda, la protéine responsable de l'état "dormant" prophagique du bactériophage lambda, qui donne un phénotype "clair" à la plaque de lyse par rapport aux plaques "troubles" du phage sauvage. Il s'agit de la mutation UV23 correspondant à une mutation G:C qui donne A:T au niveau de la quarante troisième paire
30 de bases du gène cI. Donc en fonction du brin choisi, nous avons construit le DNA du phage lambda avec un brin sauvage et un brin portant la mutation UV23, le duplex est, sinon, normal sur environ 50 000 paires de bases, excepté le mésappariement G:T ou A:C au niveau de la mutation UV23. La préparation des stocks du phage lambda et la séparation des brins dans le

gradient de chlorure de césium en présence des polymères poly (U,G) (uridine et guanosine) a été décrit par M. Meselson et R. Yuan (1968) Nature, 217 : 1110-1114.

5 Comme le système de correction des mésappariements est dirigé par la méthylation (6-méthyl-adénine) des séquences 5'GATC (Radman et Wagner (1988) Scientific American Août 1988 pour la Science, Octobre 1988), nous avons construit un ADN hétéroduplex portant la méthylation sur un seul brin. L'ADN est introduit en une seule copie dans la bactérie E. coli rendue perméable à l'ADN externe par la méthode du
10 chlorure de calcium (Mandel et Miga (1970) J. Mol. Biol. 53 : 159-162 (les bactéries en croissance exponentielle sont tenues en présence de 0,1 M CaCl_2 dans la glace, pendant 2,5 heures au moins)). Les bactéries transfectées sont étalées avec la gélose molle sur les boîtes de Petri, incubées pendant la nuit et la descendance phagique de chaque molécule
15 hétéroduplex dans les centres infectieux, est déterminée par le ré-étalement des phages repiqués de chaque centre infectieux. Trois types de centres infectieux sont possibles : pur trouble (c^+), pur clair (c), et mixtes contenant les phages c^+ et c. Les centres infectieux mixtes contiennent la descendance d'un ADN hétéroduplex non réparé : les deux brins, un c^+ ,
20 l'autre c, se sont répliqués et ont donné la descendance phagique avant qu'une réparation ait pu éliminer une base mésappariée portant le caractère c^+ ou c. Donc, un nombre important de centres infectieux mixtes signifie qu'il y a eu peu de réparation et vice versa. En outre la réparation dirigée produit les centres infectieux purs du type porté par le brin
25 méthylé et il y a donc une incidence dans le rapport c/c^+ (voir tableau 4 ci-après)

Cette méthodologie a été décrite dans Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 503-505 (1985) par Dohet Wagner et Radman.

30 Le tableau 4 ci-après montre que dans une souche mutatrice mutD5, déficiente en fidélité de la synthèse de l'ADN produisant donc beaucoup de mésappariements au cours de la réplication de son ADN, la réparation des mésappariements est déficiente.

Tableau 4 : Analyse génétique de la descendance phagique des molécules hétéroduplexes du bactériophage lambda hémiméthylées dans les diverses souches et conditions de croissance

5

10

15

20

25

30

Souche d' <u>E. coli</u>	condition de la culture	Hétéroduplex : C ⁺ —G——(r) me ⁻ C——T——(l) me ⁺ Descendance : c ⁺ c/c ⁺ c (%)		
W 3110 (mut ⁺)	32°	0	4	96
	42°	1	4	95
C ₆₀₀ (mutL)	32°	1	86	13
	42	1	92	7
W 3110 dna A (ts)	32°	0	3	97
	42°	0	3	97
KD 1079 (mut D5)	32°	0	48	52
	42	1	49	50
KD 1079 dna A (ts) mut D5	32°	1	48	51
	42°	0	10	90

En comparant les 3 % de centre infectieux mixtes de la bactérie W 3110 dna Ats avec les 48 et 49 % des centres infectieux mixtes chez la bactérie mutD5, il apparaît bien que la réparation des mésappariements est déficiente chez la mutatrice mutD5. En comparant les 49 % de centres infectieux mixtes avec les 86 à 92 % chez le mutant mutL, il apparaît que le défaut en réparation des mésappariements n'est pas total. L'arrêt d'initiation de la réplication de l'ADN bactérien chez les mutants dna Ats à 42°C pendant 2 heures, n'a pas affecté la réparation des mésappariements chez les souches autres que mutD5, dna Ats où on a pu observer la récupération de la réparation des mésappariements avec 10 % de centre infectieux mixtes. Cette récupération n'a pas eu lieu en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique, soit avec 100 µg/ml de chloramphenicol. Donc, en arrêtant la production des mésappariements par la réplication erronée, on ne retrouve la réparation que par la synthèse des protéines. Ceci suggère que la réparation des mésappariements implique un "suicide" enzymatique. La saturation correspondrait alors à une inactivation fonctionnelle d'une ou plusieurs protéines Mut. Dans les expériences décrites ci-après nous montrons que la protéine fonctionnelle manquante est la protéine Mut L.

20

Préparation de l'hétéroduplex circulaire du phage M13 mp2

L'ADN phagique et l'ADN intracellulaire sont préparés par centrifugation CsCl en présence de bromure d'éthidium comme décrit par Brooks et al. (1988) à partir du phage purifié ou après infection par les phages et incubation pendant 30 minutes. Il s'agit de méthodes standards décrites par Maniatis, Fritsch et Sambrook (1982) Molecular Cloning, Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. L'hétéroduplex est préparé en hybridant le brin d'ADN intracellulaire à double brin (RFI) linéarisé avec l'enzyme Ava II, dénaturé 10 minutes à 70°C dans l'eau, puis renaturé en présence de l'ADN simple brin pendant 10 minutes à 60°C dans le tampon 2x SSC.

L'ADN simple brin est éliminé par la cellulose-benzoylée-naphtaylée en présence de NaCl 0,1 M. L'ADN hétéroduplex avec un mésappariement G:T est gardé dans le tampon Tris 0,05 M et EDTA 0,001 M à pH 8.

5 Le mésappariement G:T porte son marquage génétique :

5' — GTT — 3' (-) bleue (lac⁺) méthyl⁻

3' — TAA — 5' (+) blanc (lac⁻) méthyl⁺

Comme précédemment avec l'ADN du phage lambda, une seule molécule entre dans la cellule rendue perméable par la méthode Hanahan (Maniatis et Coll. 1982), basé sur l'effet du calcium dithiothréitol et diméthylsulfoxyde sur les parois cellulaires. Les bactéries transfectées sont diluées et étalées avec la souche indicatrice CSH 50 (del lac-pro, ara⁻, pro⁻, str A) en présence de X-gal et IPTG pour permettre la coloration bleue des plaques phagiques lac⁺ et non celle des phages lac⁻ (mutants). Les plages de lyses mixtes (blanc/bleu) montrent l'hétéroduplex non réparé.

Le tableau 5 ci-après montre qu'en phase logarithmique de croissance, la fraction des centres infectieux mixtes est semblable chez le mutant mutL déficient en réparation et le mutant mutD. Mais en phase tardive logarithmique avant la phase stationnaire, la fraction des centres infectieux mixtes chez le mutant mutD est la même que chez le type sauvage mut⁺ donc, la mutatrice mutD est déficiente en réparation des mésappariements pendant la croissance rapide mais elle retrouve son activité de réparation lorsque la croissance ralentit.

25

30

Tableau 5 : Descendance phagique des molécules hétéroduplexes du bactériophage M13 mp2 (hétéroduplex avec mésappariement G:T) dans les souches mutatrices. Effet de la phase de croissance.

5

10

15

20

Souche d'E. coli	<u>nature et pourcentage des centres infectieux</u>							
	<u>phase log. précoce</u>				<u>phase log. tardive</u>			
	mixtes	blancs	bleus	total	mixtes	blancs	bleus	total
KA 796 (mut ⁺)	0,5	92	7,5	1120	6,9	76	17,1	1290
NR 9163 (mutL)	50,6	7,9	41,5	860	47,8	6,6	45,6	1603
NR 9066 (mutD)	40,7	22	37,3	1013	7,5	69,8	22,5	1949

25

30

Le tableau 6 ci-après montre que les gènes clonés et surexprimés peuvent récupérer l'activité de réparation des mésappariements dans la souche mutD. Spécifiquement, les gènes mutL et mutH et non les gènes mutS et mutU clonés dans le plasmide pBR325 introduits dans la souche mutD, provoquent la récupération quasi totale de l'activité de réparation. En accord avec cette observation, la fréquence des mutations spontanées décroît dans la mutatrice mutD portant le plasmide pBR325

(mutL⁺) ou pBR325 (mutH⁺) et non avec les pBR325 (mutS⁺) ou pBR325 (mutU⁺) comme il ressort du tableau 7 ci-après.

Tableau 6 : Descendance phagique des molécules hétéroduplexes (mésappariement G:T) du phage M13 mp2 dans la souche mutatrice mutD5 portant les plasmides avec les gènes mutH, mutL, mutS et mutU

Souches d' <u>E. coli</u>	<u>Nature et pourcentage des centres infectieux</u>			
	mixtes	blancs	bleus	total
NR 9066 mutD5				
- sans pBR	47,8	17,7	34,4	661
+ pBR (mutH ⁺)	6,0	77,6	16,4	1756
+ pBR (mutL ⁺)	1,3	73,3	26,2	872
+ pBR (mutS ⁺)	49,8	14,1	36,0	1186
+ pBR (mutU ⁺)	39,7	18,5	41,6	867
Segregant (mutL ⁻)	55,0	11,6	33,4	1161
KA 796 (mut ⁺)	2,6	80,3	16,9	1778
NR 9163 (mutL ⁻)	48,2	6,2	45,5	1811

Tableau 7 : Fréquences des mutations spontanées dans mutD5 portant les plasmides pBR325 (mutH, mutL, mutS ou mutU)

5	Souches d' <u>E. coli</u>	Fréquence des mutations ($\times 10^{-6}$) Rif ^R Nal ^R	
10	NR 9066 mutD5		
	- sans pBR	215,0	60,3
	+ pBR (mutH ⁺)	42,4	8,7
	+ pBR (mutL ⁺)	15,3	0,71
	+ pBR (mutS ⁺)	149,0	37,3
15	+ pBR (mutU ⁺)	165,0	36,4
	Segregant Amp ^S (mutL ⁻)	245,0	55,1
	KA 796 (mut ⁺)	0,006	0,0008

20 Ces expériences présentent la première démonstration expérimentale d'une catastrophe d'erreurs ou d'effet avalanche. Un excès d'erreurs au niveau de la synthèse de l'ADN provoque la saturation (l'inactivation) du système de réparation des mésappariements. Le résultat est un défaut double dans les systèmes de la fidélité de réplication.

25 En introduisant les plasmides mutH⁺, mutL⁺, mutS⁺ et mutU⁺ dans E. coli mutD5, on peut démontrer qu'il n'y a pas de perte d'activité de réparation quand la fonction MutL est surproduite. Donc, la protéine MutL se "suicide" dans l'acte de réparation. La mutatrice mutD5 présente le premier cas expérimental de "catastrophe d'erreurs" : trop d'erreurs au

30 niveau de la réplication du DNA qui surcharge le système de correction lequel s'effondre et provoque un effet d'"avalanche".

Donc, il suffit d'introduire d'un coup un nombre excessif de mésappariements de base dans une cellule pour que le système de réparation s'effondre et reste inactif jusqu'à la "dilution" du substrat avec les mésappariements et la resynthèse des enzyme Mut.

5

EXEMPLE 4 SATURATION DU SYSTEME DE CORRECTION DES MESAPPARIEMENTS CHEZ LES CELLULES DES MAMMI-FERES

10

15

20

Il est difficile d'isoler un mutant mut- chez les cellules de mammifères. Il s'agit de mutations récessives dans des cellules diploïdes qui nécessitent l'inactivation simultanée de deux copies du même gène. Ces mutants peuvent, en outre être létaux. Ceci est dû au fait que le polymorphisme des séquence, surtout au niveau des diverses familles de séquences répétitives, est l'élément clé de la stabilité chromosomique. C'est en effet grâce à ce polymorphisme que le système de réparation des mésappariements peut empêcher toute recombinaison dangereuse entre les séquence répétitives (aberrations chromosomiques) ou entre les chromosomes homologues (homozygotie par recombinaison mitotique), sauf la recombinaison réparatrice entre les chromatides soeurs (échange de chromatides soeurs) issues de la réplication d'une molécule-mère et ayant donc une séquence identique.

25

Trois expériences ont été tentées : suite à l'introduction dans les cellules de la souris de DNA hétéroduplex riche en mésappariements, on a cherché à déterminer si l'on pouvait :

30

- a) observer l'apparition d'aberrations chromosomiques provoqués par l'activation de la recombinaison entre les séquences répétitives diversifiées,
- b) observer l'apparition de mutations suite à des erreurs de réplication non corrigées,

c) cibler par un oligonucléotide synthétique une mutation cancerogène puis la corriger par un autre oligonucléotide.

- a) On réalise la transfection des cellules CHO (Chinese Hamster ovary) et NIH3T3 (fibroblastes de la souris) par la méthode décrite par C.Chen et H. Okayama (1987) Mol. Cell. Biol. 7 : 2745-2752 ("High efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA"). Environ 50 % des cellules sont effectivement transfectées par le DNA circulaire qu'est l'hétéroduplex M13/fd dont la préparation sera explicitée ci-après et environ 10^6 des paires de bases du DNA entrent dans la cellule, donc environ 200 molécules portant environ 35 000 mésappariements. Les plaques métaphasiques pour observer les chromosomes mitotiques condensés sont préparées d'après les méthodes classiques décrites par A.R. Kinsella et M. Radman "Inhibition of carcinogen-induced chromosomal aberrations by an anticarcinogenic protease inhibitor", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 3544-3547 et "Tumor promoter induces sister chromatid exchanges : relevance to mechanisms of carcinogenesis", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75, 6149-6153.
- b) Pour tester l'effet mutateur de la transfection par hétéroduplex riche en mésappariements, on mélange le DNA du plasmide pcD neo (Chen et Okayama (1987) Mol. Cell. Biol. 7 : 2745-2752 "high efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA") avec l'hétéroduplex. Ceci permet la sélection en présence de 400 µg/ml de néomycine G418 des cellules dans lesquelles le DNA exogène a pénétré. Parmi ces cellules, on teste la fréquence des mutations de résistance à la 6-thioguanine et à l'Ouabaine comme décrit par Kinsella et Radman (1978) P.N.A.S. USA 75, 6149-6153.
- c) Mutagenèse ciblée et programmée.
- Pour effectuer la pénétration des oligonucléotides de synthèse on peut employer plusieurs méthodes, telles que la méthode du phosphate de calcium, l'électroporation et la méthode des liposomes comme décrite par Chen et Okayama, Andreason et Evans et Mannins et Gould-Fogente respectivement dans Biotechniques, vol 6, n° 7, Juillet/Août 1988). La technique par microinjection directement dans le noyau peut également être pratiquée.

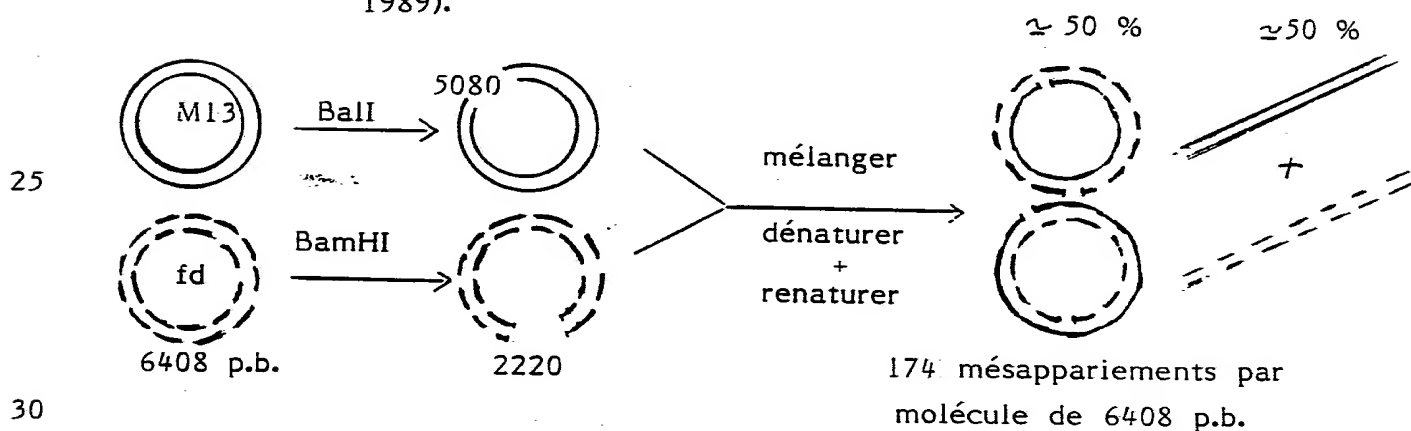
On utilise des cellules NIH3T3 de la souris pour la transformation et l'hétéroduplexe M13/fd dont la préparation est explicitée ci-après comme inactivateur du système de correction des mésappariements ainsi que l'oligonucléotide de synthèse 19-mer 5' GTTGGAGCTTGTGGCGTAG (le T souligné est la base "muté" dans beaucoup de tumeurs humaines et de rongeurs qui se trouve dans le codon 12 de l'oncogène K-ras). Le caractère cancérogène de la cellule transformée se voit par la croissance en "foyer" sur le tapis monocouche ou par la croissance dans la gélose molle. Par mutagenèse reverse avec l'oligonucléotide 5' GTTGGAGCTGGTGGCGTAG, on peut obtenir une guérison génétique.

Préparation de l'hétéroduplexe M13/fd et l'hétéroduplexe ϕ X₁₇₄/G4

On a réalisé un hétéroduplex comportant 3 % de mésappariements entre les DNAs des phages bactériens M13 et fd.

Le principe opératoire est le suivant :

- isoler le DNA intracellulaire (circulaire, double brin ou RFI),
- cliver chaque population moléculaire une fois mais à différents endroits de la molécule,
- dénaturer - renaturer,
- isoler le DNA circulaire (comme décrit par Brooks et al., 1989).



(Les séquences : Van Wezenbeek et Coll. (1980) Gene, 11 : 129-148)

Les cultures de bactéries, infections phagiques, isolement de la forme répliquative (RFI) des bactériophages M13 ou fd ont été décrits par Messing dans Methods in enzymology vol. 101, p 20-78 (1983).

La forme I (RFI) est coupée pour le phage M13 par BalI et pour le phage fd par BamHI. Après digestion enzymatique, les ADN sont dénaturés puis renaturés selon le protocole décrit par Lee, Clark et Modrich PNAS 80 4639-4643 (1983). Après action de la ligase d'E. coli, l'ADN circulaire clos par liaison covalente est purifié par centrifugation en CsCl-EtdBr.

On a également réalisé un hétéroduplex comportant 30 % de mésappariements entre les DNA des phages ϕ X 174 et G4 selon le même procédé.

Les souches suivantes ont été déposées à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15. en date du 23 DECEMBRE 1988,

Salmonella typhimurium SL4213 mut L N° I 831.

Recombinant Intergénérique SCL17 N° I 832.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. MARINUS M. and MORRIS N. (1973) J. Bacteriol 114 1143-1150.
- 5 2. TIRABY G. and SICARD A. (1973) J. Bacteriol 116 1130-1135.
3. WILLIAMSON et al. (1965) Genetics 110 609-646.
4. Ochman and Wilson in E. coli and Salmonella typhimurium Vol. 2
10 American Society for Microbiology Washington DC pp 1649-1654.
5. BARON et al (1959) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 45 976-984.
6. EISENSTARK (1965) Proc. natl. Acad. Sci. USA 54 117-120.
15
7. MERGEAY and GERITS (1983) J. Gen. Microbiol 129 321-335.
8. P. BROOKS et al. accepted for Proc. Natl. Acad. Sci. USA.
- 20 9. Maniatis et coll. (1982) Molecules cloning Cold Spring harbor Laboratory.
10. Meselson and yaun (1968) Nature 217 1110-1114.
11. Radman and Wagner (1988) Scientific american August 1988 ("Pour la
25 Science" October 1988).
12. Mendel and Miga (1970) M. Mol. Biol 53 159-162.
13. Dohet and Wagner (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 503-505.
30
14. C. Chan, H. Okayama (1987) Mol. Cell. biol. 7 2745-2752.

15. Kinsella and Radman (1978) PNAS 75 6149-6153.

16. Kinsella and Radman (1980) PNAS 77 3544-3547.

5 17. Biotechniques Vol. 6 n° 7 July/August (1988).

18. Methods in enzymology Vol. 101 pp. 20-78 (1983).

19. PNAS 80 4639-4643 (1983).

10

15

20

25

30

REVENDICATIONS

1. Procédé de recombinaison in vivo de séquences d'ADN partiellement homologues présentant jusqu'à 30 % de mésappariements de base, caractérisé en ce qu'on met en présence lesdites séquences dans des cellules ou un organisme dont le système enzymatique de réparation des mésappariements est défectueux ou a été inactivé transitoirement, notamment par saturation, le temps d'obtenir la recombinaison entre lesdites séquences d'ADN, ou encore en utilisant des mutants qui augmentent la recombinaison intergénérique.

2. Procédé de production in vivo de gènes hybrides et de leurs protéines codées, caractérisé en ce que dans un procédé selon la revendication 1 on met en présence dans ledit organisme défectueux ou inactivé dans le système enzymatique de réparation des mésappariements, deux dites séquences d'ADN consistant en des gènes partiellement homologues issus de deux organismes différents, et on sélectionne le gène hybride recherché ou sa protéine codée.

3. Procédé de production in vivo de gènes hybrides, et de leur protéines codées selon la revendication 2, dans lequel un premier gène d'un premier organisme est porté par un premier plasmide et un second gène partiellement homologue d'un second organisme sont introduits par transformation dans une bactérie dont le système enzymatique de réparation des mésappariements est défectueux ou dans tout autre bactérie mutante qui augmente la recombinaison intergénérique ou dans une bactérie dont le système de réparation des mésappariements est transitoirement inactivé, les gènes se recombinent et l'on sélectionne le gène hybride recherché ou sa protéine codée.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la bactérie transformée avec les plasmides portant les gènes à recombinaison peut être une souche E. coli ou Salmonella typhimurium défectueuse ou transitoirement inactivée dans le système enzymatique de réparation des mésappariements ou tout autre mutant de telle bactérie qui augmente la recombinaison intergénérique.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'on utilise une souche de E. coli mutS^{ts-1} thermosensible pour la fonction de réparation des mésappariements de bases, souche qui est mutatrice mutS⁻ à 42°C et normale mut⁺ à 32°C.

6. Procédé de production de cellules recombinées par des techniques de transformation ou fusion selon la revendication 1, caractérisé en ce que :

- on effectue la transformation et la recombinaison in vivo :
 - . à l'aide de l'ADN de cellules d'un organisme d'une première espèce et d'un premier genre, et
 - . avec l'ADN chromosomique des cellules d'un organisme d'une deuxième espèce et/ou d'un deuxième genre,

ces cellules de l'organisme de deuxième espèce ou genre étant défectueuses dans le système enzymatique de réparation des mésappariements de bases ou ayant ledit système inactivé transitoirement, notamment par saturation, ou bien

- on effectue la recombinaison in vivo des chromosomes de ces deux types de cellules après fusion desdites cellules, celles-ci ayant toutes deux un système enzymatique de réparation des mésappariements défectueux ou ayant ledit système inactivé transitoirement notamment par saturation.

7. Procédé de production d'organismes recombinés par croisement et recombinaison in vivo d'organismes d'espèces et/ou de genres

différents selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on effectue le croisement in vivo entre :

- un organisme d'une première espèce et d'un premier genre, et
- 5 - un organisme d'une deuxième espèce et/ou d'un deuxième genre,

l'un au moins de ces deux organismes étant défectueux dans le système enzymatique de réparation des mésappariements de bases ou ayant ledit système inactivé transitoirement, notamment par saturation.

10

8. Procédé selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce qu'on produit des bactéries, des levures, des cellules de plantes ou animales recombinées à partir d'organismes correspondants.

15

9.. Procédé de production de bactéries recombinées par croisement et recombinaison in vivo de bactéries d'espèces et/ou de genres différents selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce qu'on effectue une conjugaison ou transduction in vivo entre

20

- des bactéries dites réceptrices d'un organisme d'une première espèce et d'un premier genre qui sont défectueuses dans les systèmes enzymatiques de réparation des mésappariements de base ou dont les systèmes enzymatiques de réparation des mésappariements des bases sont inactivés transitoirement notamment par saturation le temps d'obtenir la recombinaison voulue, et

25

- des bactéries dites donneuses d'un organisme d'une deuxième espèce et/ou deuxième genre qui comporte un caractère particulier que l'on souhaite transférer aux bactéries réceptrices.

30

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que les bactéries dites réceptrices sont en outre défectives dans le système enzymatique de restriction de l'ADN.

11. Procédé de production in vivo de gènes hybrides et de leurs protéines codées à partir de deux gènes partiellement homologues, caractérisé en ce que dans un procédé selon l'une des revendications 7 à 10 un premier organisme contient un premier gène et ledit deuxième organisme contient le second gène partiellement homologue, et en ce qu'on sélectionne le gène hybride recherché ou sa protéine codée.

12. Procédé selon l'une des revendications 9 à 11, caractérisé en ce qu'on croise une souche E. Coli et une souche Salmonella typhimurium dont l'une au moins est défectueuse ou inactivée transitoirement dans le système enzymatique de réparation des mésappariements.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la souche E. coli ou Salmonella typhimurium défectueuse dans le système enzymatique de réparation des mésappariements de base est une souche $mutS^-$ ou $mutL^-$, c'est-à-dire défectueuse en protéine MutS ou MutL qui interviennent dans la reconnaissance des mésappariements.

14. Procédé selon l'une des revendications 9 à 13, caractérisé en ce que la bactérie donneuse est une souche HFr, la bactérie réceptrice est une souche mutante F^- , en cas de conjugaison.

15. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la saturation du système enzymatique de réparation des mésappariements de base se fait en introduisant un hétéroduplex riche en mésappariement.

16. Procédé de mutagenèse inverse ciblée d'un gène dans un organisme selon la revendication 1, ledit gène comportant une base mutée que l'on veut rétablir telle qu'avant sa mutation, caractérisé en ce qu'on introduit dans l'organisme un hétéroduplex comportant un nombre élevé de mésappariement pour inactiver par saturation le système enzymatique de correction des mésappariements de l'organisme et un oligonucléotide consistant dans la séquence d'ADN rétablie telle qu'avant mutation du gène.

17. Procédé selon les revendications 15 ou 16, caractérisé en ce que l'hétéroduplex provient des phages M13 et fd.

5

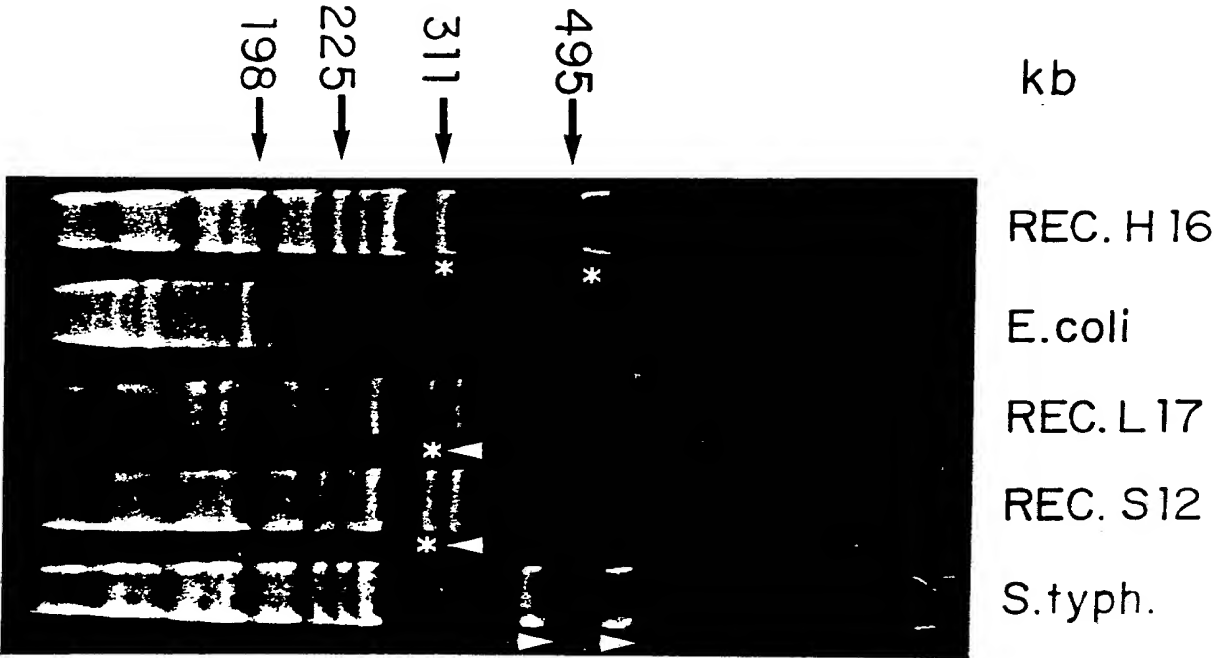
10

15

20

25

30



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 89/00673.

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. ⁵ : C 12 N 15/00, C 12 N 15/90		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched *		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. ⁵	C 12 N 15/00, C 12 N 15/70, C 12 N 15/90	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ** with indication, where appropriate, of the relevant passages **	Relevant to Claim No. **
X	Mol. Gen. Genet., volume 210, no. 2, 1987, Springer-Verlag, (Berlin, DE), A.M. Gase et al.: "Mismatch repair during pneumococcal transformation of small deletions produced by site-directed mutagenesis", pages 369-372, see the whole article	1
Y	---	2-4,6-8
Y	Journal of General Microbiology, volume 129, 1983, SGM, (Colchester, GB), M. Mergeay et al.: "Transduction of Escherichia coli trp genes in Salmonella typhimurium and effect of N-methyl-N'-nitro-N- nitrosoguanidine on transduction with heterogenetic DNA", pages 321-335 see the whole article, in particular pages 330-332, and "Discussion" cited in the application	2-4,6-8
A	-- ./.	1,9-14
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: **</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
15 March 1990 (15.03.90)		2 May 1990 (02.05.90)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
European Patent Office		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
A	Chemical Abstracts, volume 102, no. 23, 10 June 1985, (Columbus, Ohio, US), H. Bagci: "The role of mismatch repair in heterospecific transformation in Haemophilus influenzae", see page 344, abstract 200968h, & Middle East Tech. Univ. J. Pure Appl. Sci. 1983, 16(2-3), 253-62	1-3
A	Chemical Abstracts, volume 102, no. 5, 4 February 1985, (Columbus, Ohio, US), J.P. Abastado et al.: "Processing of complex heteroduplexes in Escherichia coli and Cos- 1 monkey cells", see page 141, abstract 40833e, & Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1984, 81(18), 5792-6	1-4
X	The EMBO Journal, volume 6, no. 6, 1987, IRL Press Ltd, (Oxford, GB), R.Zell et al.: "DNA mismatch-repair in Escherichia coli counteracting the hydrolytic deamination of 5-methylcytosine residues", pages 1809-1815, see abstract; page 1810, column 2; page 1811, column 2 and table II; page 1814, column 1	1
A		16,17
X	J. Mol. Biol., volume 197, no. 4, 1987, Academic Press Ltd, (Londres, GB), S. Shenoy et al.: "Repair of thymine-guanine and uracil-guanine mismatched base-pairs in bacte- riophage M13mpl8 DNA heteroduplexes", pages 617- 626, see abstract; page 624, column 2 - page 625, column 1	1
A		16,17
X	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, volume 77, no. 2, February 1980, (Washington, US), B.W. Glickman et al.: "Escherichia coli mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch correction", pages 1063-1067, see abstract; page 1065, column 2 - column 1066, column 1	1
A		2-9
P,X	Nature, volume 342, no. 6248, 23 November 1989, (Londres, GB), C. Rayssiguier et al.: "The barrier to recombination between Escherichia coli and Salmonella typhimurium is disrupted in mismatch-repair mutants", pages 396-401 see the whole article	1-17
	./..	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
P,X	<p>Chemical Abstracts, volume 111, no. 17, 23 October 1989, (Columbus, Ohio, US), P. Shen et al.: "Effect of base pair mismatches on recombination via the RecBCD pathway", see page 157, abstract 147639j, & MGG, Mol. Gen. Genet. 1989, 218(2), 358-60</p> <p>-----</p>	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 89/00673

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB ⁵ : C 12 N 15/00, C 12 N 15/90		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁵	C 12 N 15/00, C 12 N 15/70, C 12 N 15/90	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
X	Mol. Gen. Genet., volume 210, no. 2, 1987, Springer-Verlag, (Berlin, DE), A.M. Gase et al.: "Mismatch repair during pneumococcal transformation of small deletions produced by site-directed mutagenesis", pages 369-372 voir l'article en entier	1
Y	--	2-4, 6-8
Y	Journal of General Microbiology, volume 129, 1983, SGM, (Colchester, GB), M. Mergeay et al.: "Transduction of Escherichia coli trp genes in Salmonella typhimurium and effect of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on transduction with heterogenetic DNA", pages 321-335 voir l'article en entier, en particulier pages 330-332, et "Discussion" cité dans la demande	2-4, 6-8
A	-- ./. .	1, 9-14
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 15 mars 1990	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: right; font-weight: bold;">- 2 MAY 1990</div>	
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé <div style="text-align: right;">MISS D. S. KOWALCZYK</div>	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		
(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
A	Chemical Abstracts, volume 102, no. 23, 10 juin 1985, (Columbus, Ohio, US), H. Bagci: "The role of mismatch repair in heterospecific transformation in Haemophilus influenzae", voir page 344, abrégé 200968h, & Middle East Tech. Univ. J. Pure Appl. Sci. 1983, 16(2-3), 253-62	1-3
A	Chemical Abstracts, volume 102, no. 5, 4 February 1985, (Columbus, Ohio, US), J.P. Abastado et al.: "Processing of complex heteroduplexes in Escherichia coli and Cos- 1 monkey cells", voir page 141, abrégé 40833e, & Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1984, 81(18), 5792-6	1-4
X	The EMBO Journal, volume 6, no. 6, 1987, IRL Press Ltd, (Oxford, GB), R. Zell et al.: "DNA mismatch-repair in Escherichia coli counteracting the hydrolytic deamination of 5-methyl-cytosine residues", pages 1809-1815 voir abrégé; page 1810, colonne 2; page 1811, colonne 2 et tableau II; page 1814, colonne 1	1
A	--	16,17
X	J. Mol. Biol., volume 197, no. 4, 1987, Academic Press Ltd, (Londres, GB), S. Shenoy et al.: "Repair of thymine-guanine and uracil-guanine mismatched base-pairs in bacteriophage M13mp18 DNA heteroduplexes", pages 617-626 voir abrégé; page 624, colonne 2 - page 625, colonne 1	1
A	--	16,17
X	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, volume 77, no. 2, février 1980, (Washington, US), B.W. Glickman et al.: "Escherichia coli mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch correction", pages 1063-1067 voir abrégé; page 1065, colonne 2 - colonne 1066, colonne 1	1
A	--	2-9
	./..	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
P,X	Nature, volume 342, no. 6248, 23 novembre 1989, (Londres, GB), C. Rayssiguier et al.: "The barrier to recombination between Escherichia coli and Salmonella typhimurium is disrupted in mismatch-repair mutants", pages 396-401 voir l'article en entier --	1-17
P,X	Chemical Abstracts, volume 111, no. 17, 23 octobre 1989, (Columbus, Ohio, US), P. Shen et al.: "Effect of base pair mismatches on recombination via the RecBCD pathway", voir page 157, abrégé 147639j, & MGG, Mol. Gen. Genet. 1989, 218(2), 358-60 -----	1